

Estrategia de clonaje

Marta Torrecilla Parra

Paso 1: Descargar la región que queramos clonar del gen de interés (promotor, 3'-UTR...)

- Accedemos a la web de [Ensembl](https://www.ensembl.org/), que contiene los genomas completos de diversas especies.
- Seleccionamos en el desplegable la **especie** (humano, ratón...) que queramos y escribimos en la barra de búsqueda el **gen** de interés. También podemos hacer click en la especie si está entre las favoritas y nos dirige a su propio buscador.



Ilustración 1. Búsqueda por genoma y gen en Ensembl

- De entre las opciones que aparezcan, hacemos click en el **tránsito** que nos interese (el que se exprese preferencialmente en el tejido que estudiamos, por ejemplo).
- A la izquierda encontraremos un árbol de opciones de display y debajo, una serie de opciones, de entre las cuales escogeremos **Export data**.

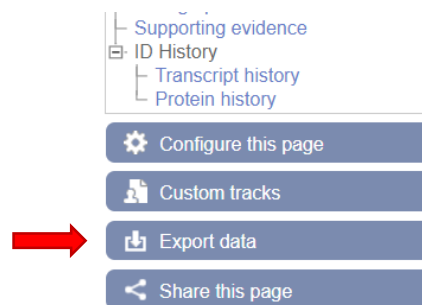


Ilustración 2. Export data

- En la Export Configuration podemos elegir **qué regiones queremos** que parezcan en la secuencia FASTA. Una vez hayamos marcado las que queramos, subimos un poco y le damos a **Next**.

Options for FASTA sequence

Genomic:	Unmasked ▼ *
Select/deselect all:	<input type="checkbox"/>
cDNA:	<input type="checkbox"/>
Coding sequence:	<input type="checkbox"/>
Peptide sequence:	<input type="checkbox"/>
5' UTR:	<input type="checkbox"/>
3' UTR:	<input checked="" type="checkbox"/>
Exons:	<input type="checkbox"/>
Introns:	<input type="checkbox"/>

Ilustración 3. Selección de regiones

- f. A continuación, te pedirá en qué formato quieres exportar el resultado. Exportarlo en **Text** te permitirá hacer Control + A para seleccionarlo todo.

Paso 2: Localizar sitios de unión de miRNAs

- Entramos en la página web de [TargetScan](#).
- Seleccionamos **especie y gen** (se puede introducir de diversas maneras, con el nombre del gen en humanos, con el código del gen o con el código del transcrito).
- Elegimos el **miRNA** del cual queremos encontrar targets en nuestro gen de interés. Se puede seleccionar por familias o escribiendo el nombre del miRNA.
- La manera más fácil de **visualizar los targets** es usar la opción [View table of miRNA sites].

[\[Show poorly conserved sites for miRNA families conserved among vertebrates\]](#)
[\[Show conserved sites for miRNA families conserved only among mammals\]](#)
[\[Show poorly conserved sites for miRNA families conserved among mammals\]](#)
[\[Show sites for poorly conserved but confidently annotated miRNA families\]](#)
[\[Show sites for other miRBase annotations, most of which are miRNA* sequences or RNA fragments misannotated as miRNAs\]](#)



[\[Download SVG image of miRNA sites\]](#)
[\[View table of miRNA sites\]](#)
[\[View human genome browser \(hg19\)\]](#)
[\[Show all species\]](#)

Ilustración 4. Ver tabla de sitios de unión del miRNA

- Hay distintos **tipos de sitios de unión** (seed types) de miRNAs en función de cuántos pares de bases complementarios con el mRNA y en qué posición se encuentren los mismatches. Lo ideal sería escoger el sitio 8-mer, que es match perfecto. Más info [aquí](#).

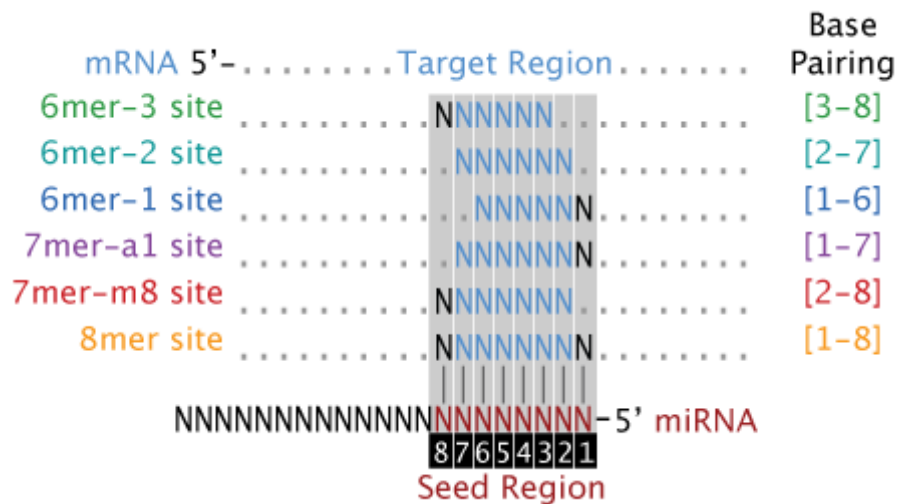


Ilustración 5. Tipos de sitios de unión de miRNAs o seed types

- f. En la tabla que te da Target Scan se lista el número de sitios de unión según su tipo. Haciendo click en el número resaltado en azul, [se abre una página](#) en la que se muestra la región en la que está unido.

miRNA family	Conserved sites				Poorly conserved		
	Total	8mer	7mer-m8	7mer-A1	Total	8mer	7mer-m8
miR-34-5p/449-5p	0	0	0	0	1	0	1
miR-199-5p	0	0	0	0	2	0	2
miR-145-5p	0	0	0	0	1	0	1
miR-7-5p	0	0	0	0	1	0	1
miR-103-3p/107	0	0	0	0	1	0	0

Ilustración 6. Tabla Target Scan

Paso 3: Diseño de primers

- Los vectores normalmente admiten insertos con un **máximo de 3kpb** así que, en caso de no poder clonar la región de interés entera en el plásmido, se buscará elegir la parte que contenga, además de sitios 8-mer, tantos sitios 7 y 6-mer como sea posible.
- La obtención del **inserto** se puede hacer utilizando DNA genómico o cDNA de un tipo celular que exprese en cantidad suficiente el mRNA en el que estamos interesados.
- Para la **construcción de primers** hay que tener en cuenta que los primers:
 - Incluyen la **secuencia de corte de dos enzimas de restricción** que estén presentes en el plásmido que se planea usar como vector pero que NO estén en el inserto que vamos a introducir. En New England Biolabs (NEB) tenemos una herramienta para comprobarlo: [NEB cutter](#).
 - Pueden comenzar con una pequeña secuencia (grapa) que puede ser una A o un triplete de C (CCC).
 - Contienen un fragmento (en naranja en la imagen) de entre 16-22 pb complementario con el gen que queremos clonar.

CCC GGTACC TCAGAACCGAGCCCTGTGAA (20 pb)

Grapa Kpn I

Ilustración 7. Ejemplo de primer para clonaje

4. Los dos primers (forward, FW y reverse, RV) deben tener temperaturas de melting (T_m) lo más parecidas posible (y que ronden los 61°C). Tanto [NEB](#) como [ThermoScientific](#) tienen herramientas para calcular T_m , %GC y temperatura de anillamiento.
 - i. Es importante tener en cuenta la polimerasa que vayamos a usar, pues cambia las T_m de los primers. En la página de NEB vienen más opciones de polimerasa que en la Thermo.
 - ii. A mayor longitud del primer, mayor T_m (generalmente).
 - iii. A mayor %GC, mayor T_m (depende también de cómo de seguidas estén las G y las C).
5. Es recomendable hacer dos sets o dos parejas de primers, de diferentes longitudes.
6. Hay que comprobar, si es posible, si existe posibilidad de que el primer **anille consigo mismo** o que forme estructuras de **horquilla** (hairpins). Existen páginas, como [OligoCalc](#), para hacerlo. Arroja información sobre posibles hairpins, complementariedad en 3' (importante porque puede evitar que el primer se una a la secuencia target) y anillamiento consigo mismo.

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allo

```
5' CCCAAGCTTGGCGATACAGCTCAG 3'
3' GACTCGCACATAGGCGTTCGAACCC 5'

5' CCCAAGCTTGGCGATACAGCTCAG 3'
3' GACTCGCACATAGGCGTTCGAACCC 5'
```

Ilustración 8. Información sobre un primer en OligoCalc

7. También las casas comerciales tienen herramientas que te permiten ver si tus dos primers dimerizarían entre ellos (**heterodimerización**), como [Thermo](#) o [IDT](#) (aunque esta última requiere registrarse).
8. Para **RT-qPCR**, existen bases de datos de **primers ya validados**. Por ejemplo: [Primer Bank](#). Comprobar aquí primero si tienen para los genes/tránscritos que nos interesan.

9. Hay software en internet que te ayuda a diseñar primers (especialmente para RT-qPCR). Uno de ellos es [Primer-BLAST](#), una herramienta del NCBI que combina Primer 3 con BLAST. Más en el documento “Cómo diseñar primers utilizando Primer-BLAST”.

Paso 4: Clonaje

- Se cultivan células que contengan el gen que queramos clonar, o bien porque lo expresen abundantemente (a) o porque lo contengan en su genoma (b) (sean de la misma especie) y se extrae el ARNm (a) o el ADN genómico (b).
- Se amplifica la secuencia por PCR usando los primers diseñados y se purifica el producto de la PCR mediante gel de agarosa. Se recorta la banda cuyo tamaño corresponda al tamaño previsto para el inserto que estamos amplificando y se extrae mediante kit comercial.
- Se digieren el inserto purificado y el vector con las dos enzimas de restricción elegidas. En el caso del vector, se hace junto con fosfatasa alcalina para que no pueda recircularizarse y los fosfatos requeridos para la unión estén solo en el inserto.

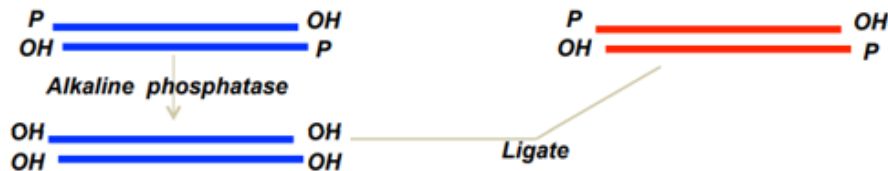


Ilustración 9. Fosfatasa alcalina para evitar recircularización del vector + ligasa

- Se purifican también los productos de digestión y se ligan con ligasa de T4. El inserto y el vector deben mezclarse preferentemente en concentraciones equimolares para evitar ligaciones no específicas.

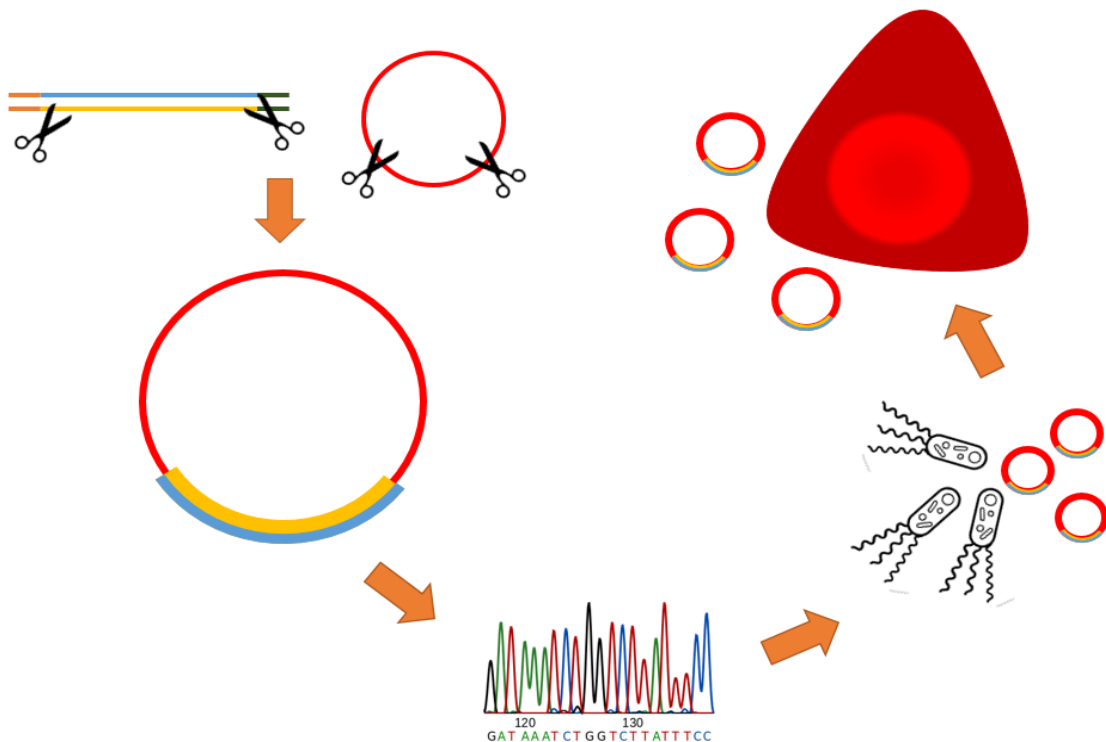


Ilustración 10. Secuencia esquemática de clonaje

- e. Para comprobar si el inserto se ha introducido correctamente y en la dirección que deseábamos, se manda el plásmido a secuenciar.
- f. Una vez comprobado, se transforman bacterias *E. coli* DH5α para que crezcan el plásmido. Las bacterias transformadas serán resistentes a ampicilina, lo cual nos permitirá seleccionar colonias al tratarlas con este antibiótico. El ADN plásmídico se aislará por lisis alcalina mediante kits comerciales (Mini o Midiprep).

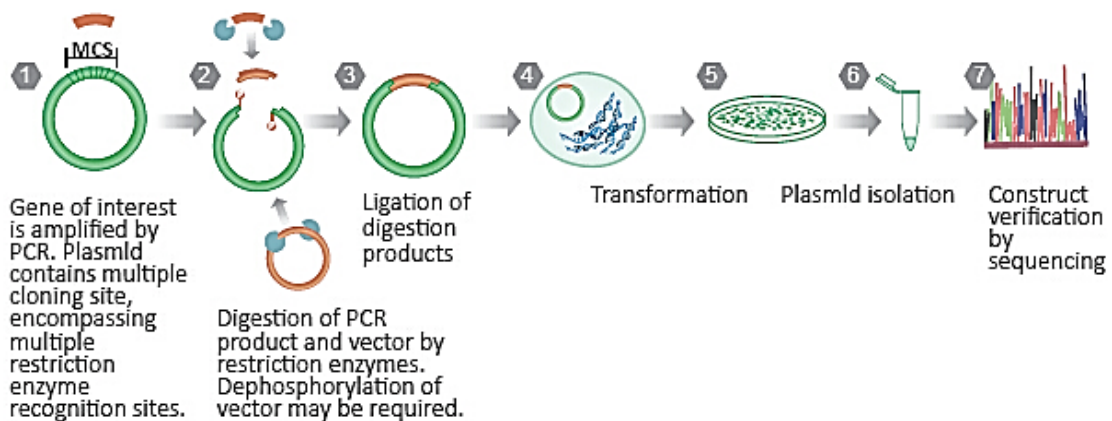


Ilustración 11. Secuencia esquemática de clonaje II

- g. Se cotransfectan con la ayuda de Lipofectamina las células eucariotas donde queramos expresar el plásmido (pueden ser HeLa o COS7) con el plásmido de interés y un plásmido control o nulo (sin inserto) que exprese la luciferasa de Renilla para poder

normalizar. La normalización también se podría realizar con la concentración de proteína total determinada por Bradford o Lowry.

- h. Una vez las células estén transfectadas, se pueden realizar los experimentos que se deseen, como comprobar si el promotor introducido es inducible o reprimible por un determinado factor de transcripción (FT), realizar mutagénesis dirigida en sitios de unión a FT predichos para confirmar que lo sean o evaluar si la expresión de una determinada proteína es regulable por condiciones del medio como el tratamiento con insulina.

Vectores

1. **Vector para promotores, pGL3-Basic:** el sitio de policlonaje (donde se encuentran las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción) está 5' al gen reportero. Este gen (luciferasa, *luc+*) no se transcribe si no introducimos un promotor en el sitio de policlonaje. Selección de colonias por ampicilina. **Las enzimas que usamos para estos clonajes son:**
 - a. [KpnI](#) (secuencia: GGTACC)
 - b. [HindIII](#) (secuencia: AAGCTT)

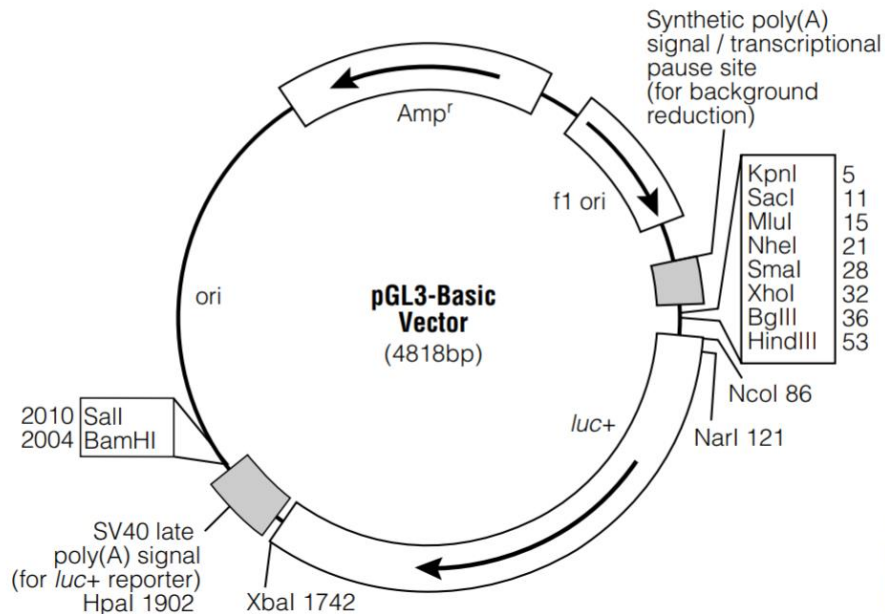


Ilustración 12. Vector pGL3-Basic

2. **Vector para 3'UTR, psiCHECK-2:** el sitio de policlonaje principal está detrás (3') del gen reportero (luciferasa de Renilla, hRluc), para poder colocar una región 3'UTR reguladora en ese extremo. Dispone de una segunda luciferasa (hluc+) para cuantificar la eficiencia de transfección. Selección por ampicilina. **Las enzimas que usamos para estos clonajes son:**
 - a. [XhoI](#) (secuencia: CTCGAG)
 - b. [NotI](#) (secuencia: GCGGCCGC)

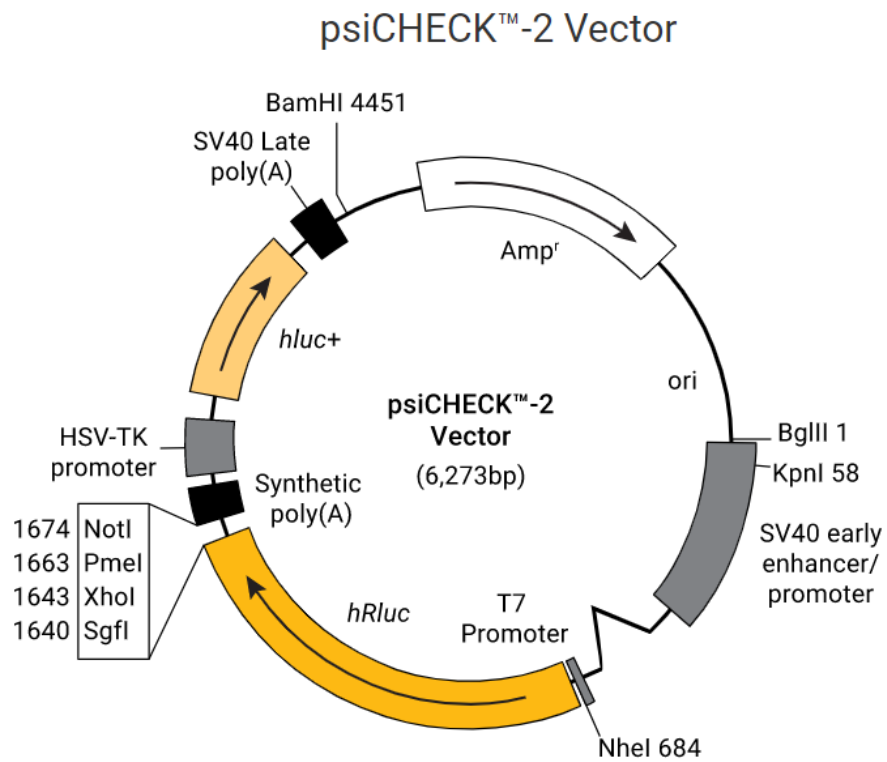


Ilustración 13. Vector psiCheck-2

Fragmento a clonar

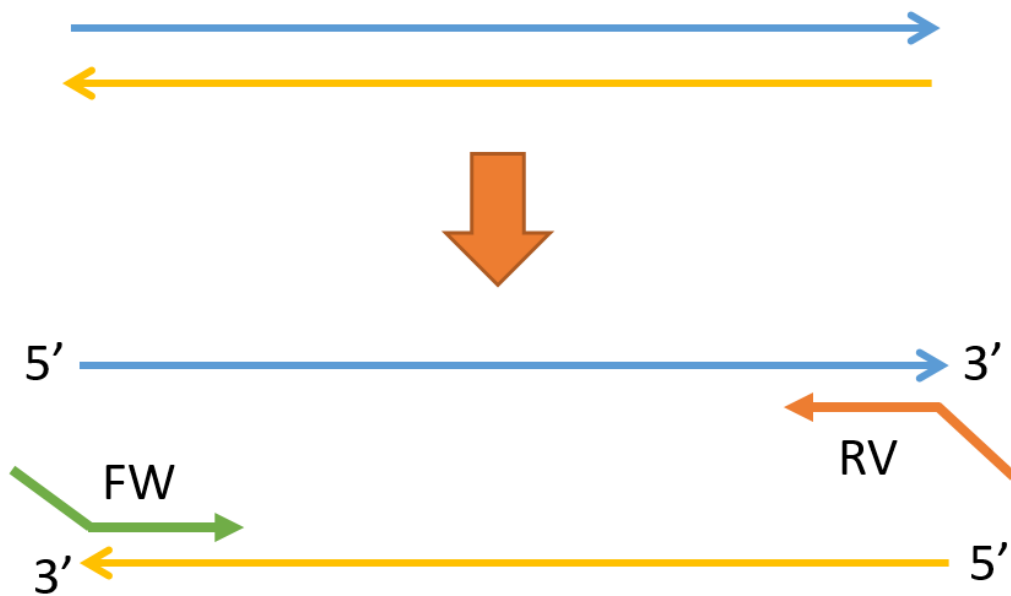


Ilustración 14. Ejemplo de situación de los primers en el molde a clonar